

# Ex vivo Thrombopoese: Könnten Blutplättchen im Labor produziert werden?

## Zusammenfassung.

Die Normalwerte für Thrombozyten von Erwachsenen betragen ca.  $150\text{--}400 \times 10^3/\mu\text{l}$  mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 7–10 Tagen. Die Thrombozytentransfusion ist ein integraler Bestandteil der modernen Medizin und wird zur Behandlung von thrombozytopenen Patienten bzw. Patienten mit Thrombozytenfunktionsstörungen angewendet. Thrombozyten werden bei Raumtemperatur gelagert, um die Funktionalität aufrecht zu erhalten. Dadurch wird das Risiko von bakteriellem Wachstum im Konzentrat gesteigert. Wegen der kurzen Haltbarkeit und der schwierigen Planung von Angebot und Nachfrage wurde nach alternativen Quellen für die Thrombozytenproduktion gesucht. Der nachfolgende Artikel widmet sich insbesondere der Überlegung Thrombozyten ex vivo zu generieren.

## Summary

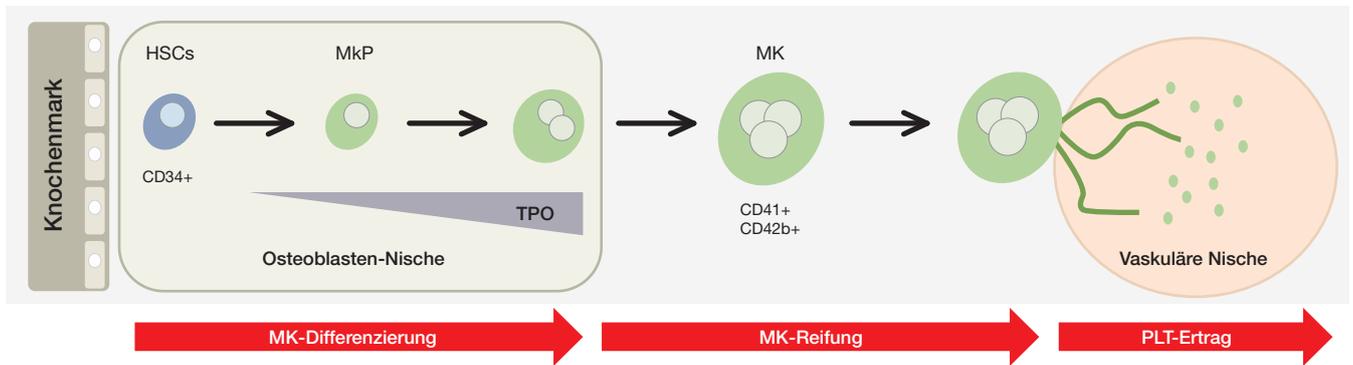
In the human body, normal platelet (PLT) count is around  $150\text{--}400 \times 10^3/\mu\text{l}$  with a short life span of 7–10 days. Clinically, PLT transfusion is the first-line treatment for hematological diseases and trauma, for which growing and constant demand is severely limited due to the fact that PLT production is totally donor-dependent. Additionally, PLTs must be stored at room temperature to maintain viability, which limits their shelf-life to only 5 days increasing the risk of bacterial contamination. In this context, alternative sources for platelets production have received attention, especially those that generate platelets ex vivo.

## EINFÜHRUNG IN DIE IN VIVO THROMBOPOIESE

Die Thrombopoese ist ein Prozess, durch den Thrombozyten (PLTs) als kernlose Zellen aus dem Knochenmark von den Megakaryozyten (MKs) freigesetzt werden. Die MKs sind polypoide Zellen (enthalten bis zu 64 vollständige Chromosomensätze) und sind unipotent, d.h. sie haben bereits den größten Teil der Differenzierungsmöglichkeiten von Stammzellen verloren und können sich nur zu Thrombozyten differenzieren. Die multipotenten Vorläuferzellen der MKs sind die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die sog. CD34-positiven Zellen. Während des Differenzierungsprozesses treten HSCs in die Osteoblasten-Nische ein und migrieren in Richtung der perivaskulären Nische, wo sie sich vollständig differenzieren. Für die Differenzierung von HSCs zu MKs und deren weitere Differenzierung zu normalen Thrombozyten ist Thrombopoietin (TPO) verantwortlich.

Die exakten Mechanismen der TPO-vermittelten Thrombozytenproduktion sind noch nicht vollständig geklärt. Vereinfacht dargestellt bindet das TPO an die c-MPL-Rezeptoren der CD34-positiven Zellen, um diese zur Osteoblasten-Nische zu leiten. Hier differenzieren sich die pluripotenten CD34-positiven Zellen in unipotente Zellen namens MK-Progenitorzellen (MKP). Anschlie-

ßend findet eine Reifung zum vollständig differenzierten MK (**Abbildung 1**) statt. Die Reifung von MKs ist geprägt von einer massiven Größenzunahme und der Anreicherung an hoch spezialisierten Granula (alpha- und delta-Granula). Der maximale Zelldurchmesser der MKs beträgt am Ende der Reifung ca. 50–100 µm. Der Grund für diesen großen Durchmesser ist, dass MKs von Mitose auf Endomitose, d.h. auf die Vermehrung der Chromosomenzahl ohne Kernteilung, umstellen. Dieser Mechanismus erklärt, warum reife MKs polypoide Zellen sind und einen DNA-Gehalt von bis zu 128N mit bis zu 64 Chromosomensätzen erreichen können. Diese Größenzunahme führt außerdem zur Bildung eines eingestülpten Membransystems, das als Membranreservoir für Proplatelets agiert. Die Polyploidie wird als wichtig für MKs erachtet, um den zytoplasmatischen Inhalt, der bei der Bildung der Thrombozyten benutzt wird, anzusammeln. Tatsächlich wird geschätzt, dass ein einziger MK im Knochenmark 1000–2000 PLTs erzeugen kann, bevor die Membran erschöpft ist. Danach wird der verbleibende Zellkörper abgebaut. Die von der Megakaryozytenmembran abgeschnürten Proplatelets treten in die Sinusoide des Knochenmarks ein und teilen sich in der letzten Phase der Thrombopoese durch den Blutfluss in Blutplättchen auf. Während des Differenzierungsprozesses ändern die Zellen ihren spezifischen Marker von CD34-positiv auf CD41-positiv und CD42b-positiv (**Abbildung 2**).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Thrombopoese**

Die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) sitzen in der Knochenmark-Mikroumgebung, der sogenannten Osteoblasten-Nische. Die HSC beginnen bei Vorhandensein von Thrombopoietin (TPO) mit dem Reifungsprozess. Der erste Schritt ist die Differenzierung von HSC in die Megakaryozyten-Progenitoren (MkP). Diese Zellen durchlaufen einen Prozess namens Endomitose, der durch die DNA-Replikation ohne Zellteilung gekennzeichnet ist, wodurch die Größe der MK zunimmt. Am Ende des Reifungsprozesses weiten die MK ihre Membranen aus und erzeugen Proplatelets, die in die Sinusoide eintreten und Blutplättchen in den Blutstrom freisetzen.

Die MK-Differenzierung und Thrombozytenproduktion ist ein essentieller Schritt zur möglichen ex vivo Produktion von Thrombozyten zur Transfusion. Zur Überprüfung der Qualität und Funktionalität der gewonnenen Zellen gibt es mehrere Parameter, die mittels verschiedener Techniken überprüft werden können. Die Zellmorphologie und Organisation des Zytoskeletts kann durch die Mikroskopie analysiert werden. Darüber hinaus kann die Expression von spezifischen Markern und der spezifische DNA-Inhalt während der Differenzierungsschritte mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die diploiden CD34-positiven Zellen besitzen eine typische runde Form, MKs sind im Gegensatz dazu polyploide Zellen mit einem Membranfortsatz (**Abbildung 2A**).

In der Durchflusszytometrie werden überwiegend für den jeweiligen Reifungsgrad der Zelle spezifische Oberflächenmarker untersucht. So exprimieren HSCs den CD34-Marker, während reife MKs doppelt positiv auf die Marker CD41 und CD42b sind und Thrombozyten CD41 exprimieren (**Abbildung 2B**). Um die Qualität von MKs bezüglich ihrer potentiellen Teilungsfähigkeit zu beurteilen, ist es sinnvoll, die DNA-Menge durch Durchflusszytometrie unter Verwendung von Propidiumiodid (PI) zu quantifizieren (**Abbildung 2C**). Während der in vitro Differenzierung von MKs und PLTs sollten all diese Merkmale getestet werden, um eine korrekte Thrombopoese zu bestätigen.

## ERKENNTNISSE ÜBER DIE THROMBOPOIESE AUS ANGEBORENEN THROMBOZYTENSTÖRUNGEN

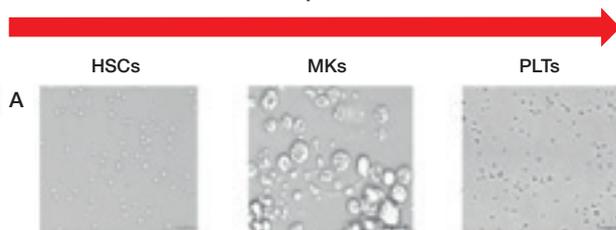
Forschung im Bereich der hereditären Thrombozytenerkrankungen unterstützt die Entdeckung von wichtigen

Proteinen und Wachstumsfaktoren, die für eine effektive Thrombopoese erforderlich sind. Die Möglichkeit, Megakaryozyten von Patienten mit angeborenen Thrombozytenerkrankungen zu kultivieren, hat unser Wissen über die zellulären und molekularen Mechanismen der Thrombopoese stark erweitert.

Einige Formen der angeborenen Thrombozytenerkrankungen sind gekennzeichnet durch das Fehlen von oder der stark reduzierten Menge an MKs im Knochenmark, zum Beispiel bei der kongenitalen amegakaryozytären Thrombozytopenie (CAMT). Die geringe Thrombozytenzahl bei Patienten mit CAMT wurde in Verbindung mit einer autosomal-rezessiven Mutation im MPL, dem Gen für den TPO-Rezeptor c-MPL, gebracht. Eine Mutation im MPL-Gen führt entweder zu einer Strukturveränderung im c-MPL-Rezeptor mit verminderter funktioneller Aktivität oder zum kompletten Ausfall des Rezeptors. Die Patienten haben eine hohe TPO Konzentration, jedoch lassen sich weder die hämatopoetischen Stammzellen, noch die Megakaryozyten durch TPO aktivieren. Die Erkenntnis, dass MKs bei CAMT fehlen oder stark reduziert sind, indiziert klar, dass die Interaktion zwischen TPO und c-MPL für die Determination und Differenzierung von multipotenten Stammzellen zu Megakaryozyten enorm wichtig ist. Der c-MPL-Rezeptor hat damit eine Schlüsselfunktion in der Thrombozytenproduktion.

Ein weiteres Beispiel ist das Gray-Platelet-Syndrom (GPS). Hier wurde festgestellt, dass es mit einem charakteristischen Defekt in der MK-Reifung verbunden ist, der zur Makrothrombozytopenie und zum Fehlen der Alpha-Granula führt. Biallelische Mutationen mit Funktionsverlust des Neurobeachin-like Protein 2 (NBEAL2) stellten sich als Ursache der Erkrankung heraus. Wir lernten von die-

## Thrombopoese in vitro



<b>B</b>	<b>Marker</b>	CD34+: 98,1 %	CD41+/CD42b+: 84,7 %	CD41+: 99,5 %
<b>C</b>	<b>Polyploidie (PI)</b>	2N	2N, 4N, 8N, 16N	negativ

## Abbildung 2: Identifikation von in vitro produzierten Megakaryozyten und Blutplättchen

(A) Repräsentative Hellfeldabbildungen von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs, Maßstabsbalken 20 µm), Megakaryozyten (MKs, Maßstabsbalken 20 µm) und Blutplättchen (PLTs, Maßstabsbalken 10 µm). (B) Durchflusszytometrie der Marker-Expression für jeden Zelltyp. HSCs sind CD34-positiv (98,1 %), MKs sind doppelt positiv auf CD41 und CD42b (84,7 %) und PLTs sind CD41-positiv (99,5 %). (C) Durchflusszytometrie des DNA-Inhalts unter Verwendung von Propidiumiodid (PI) als DNA-Farbstoff. HSCs sind diploide Zellen (2N), MKs sind polyploide Zellen (2N, 4N, 8N, 16N) und PLTs sind kernlose Zellen (negatives Signal für PI).

ser Erkrankung, dass fehlerhafte Interaktionen zwischen (Membran und intrazellulär) Proteinen zu einer beeinträchtigten Membran-Dynamik führen und damit auch den Vesikeltransport innerhalb der Zelle stören. Zusätzlich zum Mangel an Alpha-Granula kommt es durch strukturelle Anomalien von reifen MKs zu einer zytoplasmatischen Vakuolisierung, die zu einer anormalen Lokalisation des vWF in den vergrößerten Thrombozyten führt.

Bei anderen Formen von angeborenen Thrombozytenerkrankungen ist der hauptsächlich pathogene Mechanismus eine veränderte Bildung von Proplatelets, wobei die Differenzierung und Reifung von MK erhalten bleibt. Ein Beispiel dafür ist das Bernard-Soulier Syndrom (BSS), das durch biallelische Mutationen von GP1BA, GP1BB oder GP9 entstehen kann. Mutationen führen zu einer funktionslosen oder fehlenden Expression von GPIba, GPIIb und GPIX auf der Thrombozytenoberfläche. Die meisten dieser Patienten zeigen riesige Blutplättchen. Interessanterweise schnüren die von diesen Personen kultivierten MKs keine Proplatelets ab, was nahelegt, dass die angeborene Thrombozytenerkrankung von einem Defekt der letzten Phasen der Megakaryopoese verursacht wird. Dies bestätigt die Wichtigkeit der Interaktion zwischen Membranproteinen und extrazellulären Matrixproteinen, wie z.B. von Willebrand-Faktor und Kollagen. Zusammengefasst: Die translationale Erforschung der Thrombozytenstörungen bietet wertvolle Informationen zur Thrombopoese und wird zur Verbesserung der ex vivo Produktion von menschlichen Blutplättchen beitragen.

## EX VIVO THROMBOZYTENPRODUKTION

Auch unter der Anwendung der Erkenntnisse aus den angeborenen Thrombozytenerkrankungen hinsichtlich der Differenzierung von MKs haben Wissenschaftler versucht, CD34-positiv Zellen ex vivo in die MK-Abstammungslinie einzuführen. CD34-positiv Progenitorzellen können aus verschiedenen Quellen gewonnen wer-

den. Sie können aus dem Knochenmark, peripherem Blut, Nabelschnurblut, humanen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) oder humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) gewonnen werden. Im Jahr 1995 wurde erstmals berichtet, dass menschliche Megakaryozyten und Blutplättchen in vitro aus CD34-positiven, aus dem peripheren Blut gewonnenen Vorläuferzellen erzeugt werden konnten. Leider sind aus Nabelschnurblut in vitro generierte MKs generell kleiner. Sie sind weniger polyploid, das heißt sie besitzen eine geringere Anzahl an Chromosomensätzen als in vivo und haben nur eine beeinträchtigte Funktionalität. Durch die geringere Masse schnüren sie wesentlich weniger Blutplättchen ab. So entstehen nur 3–10 Thrombozyten pro MK. Humane ES-Zellen und hiPCs verfügen über ein großes Potential als unbegrenzte Quellen für Zellen zu dienen, die in einer Kultur expandiert und in Megakaryozyten differenziert werden können. Genauer gesagt sind ES-Zellen pluripotente Stammzellen, die von der inneren Zellmasse eines Präimplantationsembryos im Frühstadium (Blastozystenstadium) gewonnen werden können. In den letzten Jahren wurden verschiedene humane ES-Zellreihen benutzt, um MKs und PLTs zu gewinnen. Jedoch gibt es auch hier Nachteile. Die gewonnenen MKs verfügen ebenfalls nur über eine begrenzte Expansionskapazität. Da es sich um Primärzellen handelt, besteht auch die Sorge hinsichtlich des Risikos einer Kontamination mit Viren, HLA-Inkompatibilität und von angeborenen Erkrankungen. ES-Zellen sollten vor der Benutzung genetisch untersucht werden. Ethisch gesehen ist die Gewinnung von MK-Zellen aus ES-Zellen, die die Zerstörung eines Embryos erfordert, kritisch. All diese Bedenken führen zu einer komplizierten behördlichen Zulassung für die Entnahme von Zellen.

Eine andere Möglichkeit, Thrombozyten in vitro zu produzieren, ist die Anwendung von hiPSCs. Diese Zellen sind pluripotente Stammzellen, die von adulten Zellen generiert werden können, indem Transkriptionsfaktoren eingeführt und verändert werden, um MKs und PLTs zu produzieren. HiPSCs können potentiell unbegrenzt in Kultur

gehalten werden und bieten so theoretisch eine unbegrenzte Anzahl von CD34-positiven Zellen. Durch die bessere Skalierbarkeit der Thrombozytenproduktion können die Einzelkosten von PLT weiter gesenkt werden.

## VORTEILE VON iPSCS ALS QUELLE FÜR DIE THROMBOZYTENPRODUKTION

iPSCs werden als die favorisierte Quelle für die in vitro Thrombozytenproduktion betrachtet. Dies nicht nur auf Grund ihrer Fähigkeit, sich unbegrenzt zu vermehren, sondern auch wegen der deutlich geringeren ethischen Bedenken. Tatsächlich bietet der Einsatz von iPSCs als Quelle für die Generierung von Thrombozyten mehrere Vorteile. Zum Beispiel haben iPSCs die Fähigkeit, jegliche somatische Zellen im Körper zu einer potentiellen Quelle für MKs zu machen; sogar Zellen, die von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen stammen. Demzufolge sind autologe iPSCs und iPSCs von HLA-identen Spendern, die aktuell für potentielle Allografts gelagert werden, als Quelle zur Thrombozytentransfusion geeignet. Darüber hinaus könnten durch die Manipulation der HLA- oder HPA-Expression von iPSC abgeleiteten PLTs die von diesen Molekülen hervorgerufenen alloimmunen Reaktionen vermieden werden.

iPSCs Zellen können sich unbegrenzt teilen, bei gleichzeitiger Bewahrung der Unipotenz, wodurch weniger Bedenken hinsichtlich der Kontamination von Zellen bestehen. Einzigartig bei den aus iPSCs gewonnen MKs ist die Möglichkeit der Kryokonservierung, wodurch diese viel länger als andere abgeleitete MKs gelagert werden können. Hierdurch kann die Lebenszeit der MKs von 2 auf 5 Monate gesteigert werden. Diese Eigenschaft könnte den geringeren Ertrag an Blutplättchen pro MK kompensieren, da möglicherweise erreicht werden kann, eine größere Anzahl an MKs zu lagern und bei Bedarf darauf zuzugreifen. Beruhend auf diesen Überlegungen – auch wenn eine perfekte in vitro Methode für die Generierung der gleichen Menge an PLTs wie unter physiologischen Bedingungen noch nicht verfügbar ist – stellen iPSCs ein revolutionäres Werkzeug für die Transfusionsmedizin dar.

## HLA-UNIVERSELLE iPSC-ABGELEITETE PLTS

Bei Patienten mit multiplen Transfusionen in der Anamnese wird teilweise ein Refraktärzustand gegenüber der Thrombozytentransfusion beobachtet. Diese Refraktärität wird im Zusammenhang mit unerwünschten Ereignis-

sen, mit einem erhöhten Risiko an Blutungen und verringertem Überleben gesehen. Die Hauptursachen, die zum Refraktärzustand bei Thrombozytentransfusionen führen, sind die Alloimmunisierung gegenüber HLA- oder humanen Plättchenantigenen aufgrund einer vorherigen Transfusion, Schwangerschaft oder Transplantation. Zurzeit beruht die Behandlung von Patienten mit Refraktärzustand gegenüber Thrombozytentransfusion auf HLA-Matching oder Crossmatching der Thrombozyten. Vor kurzem wurde das Konzept der Generierung von HLA-universellen Blutplättchen entwickelt, wobei verschiedene Werkzeuge, wie RNA-Interferenz (RNAi) oder Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9) benutzt wurden. Es wurde gezeigt, dass das Silencing der HLA-Expression unter Verwendung von RNAi eine allogene Immunreaktion in vitro und in vivo verhindert. Es ist zu beachten, dass die residuale Expression der HLA-Klasse I wesentlich ist, um die natürliche Killer-Zytotoxizität zu verhindern. Mehrere Studien haben gezeigt, dass in einem Maus-Modell für den PLT-Refraktärzustand von iPSC abgeleitete HLA-universelle Blutplättchen ausreichendes Überleben zeigten. Diese Daten legen nahe, dass in vitro hergestellten MKs und PLTs mit geringer Immunogenität bei auf Thrombozyten beruhenden Therapien eine Alternative zur Thrombozytenspende und somit eine Komponente bei der Behandlung von Patienten mit schwerer Alloimmunisierung werden können.

## AKTUELLER STAND DER GROSS(LARGE-SCALE)-PRODUKTION VON THROMBOZYTEN UNTER VERWENDUNG VON BIOREAKTOREN

Trotz aller Anstrengungen, MKs und PLTs in vitro zu produzieren, ist die Anzahl der generierten Zellen für klinische Anwendungen nicht ausreichend (3–10 Thrombozyten pro MK). Eine mögliche Erklärung ist, dass die ex vivo Generierung in einer statischen Kultur durchgeführt wurde, die nicht den Blutfluss, der die Proplatelets in der richtigen Größe erzeugt, nachahmte. Um diese Einschränkung zu beheben und die physiologischen Bedingungen in vivo zu imitieren, wurden verschiedene Arten von Bioreaktoren entwickelt. Bioreaktoren enthalten eine dreidimensionale Kultur, die die Oberfläche der MKs erhöht, um die Bildung von Blutplättchen durch solche Scherkräfte zu fördern, wie sie im Blutfluss vorliegen und die Bildung der Blutplättchen an der Proplatelet-Spitze innerhalb des Knochenmark-Blutgefäßes in vivo einleiten. Bioreaktoren, die auf optimale Scherkraft, Schichtdicke (extrazelluläre Matrixproteine) und Medienzusammensetzung aus-

gelegt sind, zeigten eine signifikante Steigerung sowohl der Anzahl als auch der Rate an gebildeten Blutplättchen (Ertrag von 30–70 PLTs pro MK). Außerdem können aufgrund der Unabhängigkeit der Bioreaktoren von der MK-Quelle diese einfach an zukünftige Differenzierungsmodelle bei den Stammzellkulturen angepasst werden. Ein Ertrag von ~100 PLTs pro MK reicht aus, um präklinische/klinische Studien zu unterstützen. Damit im Labor generierte PLTs im Vergleich zu von Spendern gewonnenen PLTs preislich wettbewerbsfähig sind, ist ein Ertrag von  $\geq 1000$  PLTs pro MK (physiologischer PLT-Ertrag) erforderlich.

## GMP-PRODUKTION UND DER BEDARF AN QUALITÄTSKONTROLLEN

Zurzeit werden aufgrund ihrer Verfügbarkeit, großen Skalierbarkeit und geringen ethischen Bedenken native oder gentechnisch veränderte iPSCs als die vielversprechendste Quelle von Zellen für in vitro Blutplättchenproduktion angesehen. Um jedoch sichere klinische Produkte für die Transfusions- und regenerative Medizin von in vitro differenzierten PLTs zu erreichen, müssen die entwickelten Protokolle die spezifischen GMP-Anforderungen, einschließlich Durchführbarkeit, Praktikabilität und hohem PLT-Ertrag und -Qualität adressieren. Bei der GMP-konformen in vitro Herstellung von Blutplättchen müssen folgende Aspekte berücksichtigt werden:

1. Sicherheit der Quelle der Vorläuferzelle: Die Anamnese des Stammzellspenders sollte bekannt sein und die Strategie der Reprogrammierung der Zellen der Quelle für induzierte pluripotente Stammzellen muss in GMP-Compliance sein. Darüber hinaus sollte der Ansatz der Reprogrammierung vorzugsweise nicht-integrative Vektoren benutzen. Außerdem muss das Produkt der differenzierten PLTs oder MKs bestrahlt werden, um das Risiko von ruhenden, möglicherweise Tumor auslösenden Zellen zu reduzieren.
2. Differenzierungsprotokolle sollten xenogene Komponenten vermeiden. Dementsprechend werden eine Serum-/Feeder-freie Kultur und die Verwendung von tierfreien Antibiotika und Cytokinen empfohlen.
3. Es sollte jegliches Kontaminationsrisiko eliminiert werden, z. B. durch die Verwendung von automatisierten Systemen für die Kulturen. Die Umsetzung dieser Sicherheitsaspekte wird ein großer Schritt hinsichtlich der Umsetzung der ex vivo Thrombozytenproduktion in die klinische Anwendung sein.

## SCHLUSSFOLGERUNGEN UND ZUKÜNFTIGE ASPEKTE

Thrombozyten werden zurzeit ausschließlich von menschlichen Spendern gewonnen, wobei ein begrenztes Angebot herrscht und Bedenken hinsichtlich der Sicherheit aufgrund der Lagerbedingungen bestehen. Während es zurzeit möglich ist, menschliche MKs von ES-Zellen, Nabelschnurblut und iPSCs zu isolieren und zu kultivieren, bleibt es ein Problem, menschliche MKs dazu anzuregen, eine ausreichende Anzahl an Blutplättchen zu produzieren, damit es klinisch und wirtschaftlich rentabel wird. Durch die weitere Erforschung von wichtigen physiologischen notwendigen Aspekten der Thrombozytenproduktion in skalierbaren mikro-/makrofluiden Bioreaktoren könnte es in der Zukunft möglich sein, weniger riskante und funktionelle menschliche, im Labor generierte Thrombozyten herzustellen, die die für die klinische Anwendungen erforderlichen Erträge erreichen.

### Die Autoren



**Dr. rer. nat. Irene Marini**

Transfusionsmedizin-Universitätsklinikum  
Tübingen (UKT)  
irene.marini@med.uni-tuebingen.de



**Dr. med. Karina Althaus**

Fachärztin für Transfusionsmedizin,  
Zusatzbezeichnung Hämostaseologie  
Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin  
Tübingen gGmbH (ZKT)  
karina.althaus@med.uni-tuebingen.de



**Univ. Prof. Dr. med. Tamam Bakchoul**

Facharzt für Transfusionsmedizin,  
Zusatzbezeichnung Hämostaseologie  
tamam.bakchoul@med.uni-tuebingen.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: [www.drk-haemotherapie.de](http://www.drk-haemotherapie.de)